VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG DES ENZYMIMMUNOASSAYS MIT DEM HÄMAGGLUTINATIONSHEMMUNGSTEST UND DEM HÄMOLYSE–IN–GEL–TEST IN DER RÖTELNDIAGNOSTIK

Rita Arndt

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523704_0027

Aus dem Zentrum der Hygiene
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Abteilung für Medizinische Virologie
(Leiter: Prof. Dr. G. May)

Vergleichende Untersuchung des Enzymimmunoassays mit dem Hämagglutinationshemmungstest und dem Hämolyse-in-Gel-Test in der Rötelndiagnostik

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
des Fachbereichs Humanmedizin der Johann
Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von Rita Arndt aus Frankfurt

Frankfurt am Main, 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. H.J. Müller

Referent: Prof. Dr. G. May

Koreferent: Prof. Dr. P. Schopf

Tag der mündlichen Prüfung: 24.3.83

Druck: Dipa - Druck, 6000 Frankfurt, Tel. 55 61 88

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Problemstellung	1
2.	Untersuchungsgut und Methoden	2
2.1	Sera	2
2.2	Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das Rötelnvirus	2
2.3	Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgM-Antikörpern	4
2.4	Hämagglutinationshemmungstest	6
2.5	Hämolyse-in-Gel-Test	10
3.	Ergebnisse	11
3.1	Vergleich des EIA-Tests mit dem HAI-Test	11
3.2	Vergleich des EIA-IgG-Tests mit dem HIG-Test	14
3.3	Gegenüberstellung von EIA und HIG-Test im Vergleich zum HAI-Test	16
3.4	Vergleich des EIA-Diagnostikquotienten mit der HAI-Ratio	18
3.5	IgM-Antikörperbestimmung mittels EIA bei akuter Rötelninfektion	18
3.6	Verteilung der EIA-IgG-Indices	20
4.	Diskussion	22
5.	Zusammenfassung	30
6.	Literaturverzeichnis	32

Problemstellung

Der Nachweis spezifischer Antikörper im Patientenserum ist die Methode der Wahl in der Rötelndiagnostik. Von praktischer Bedeutung ist - wegen einer möglichen Rötelnembryopathie insbesondere bei Frauen im gebärfähigen Alter - die Bestimmung der Immunitätslage und die Feststellung einer frischen Infektion. Dazu stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung wie z.B. der Neutralisationstest, der Immunfluoreszenz- und Immunadhärenztest, die Komplementbindungsreaktion, der Hämagglutinationshemmungstest und der Hämolyse-in-Gel-Test.

Die Verwendung von enzymmarkierten Antikörpern in quantitativen Immunoassays wurde von Miles u. Hales im Jahre 1968 vorgeschlagen. Engvall u. Perlmann sowie van Weemen u. Schuurs beschrieben 1971 den ersten Enzymimmunoassay (EIA). Nach der ersten Anwendung dieses Verfahrens in der Rötelndiagnostik im Jahre 1975 (Voller u. Bidwell) stehen inzwischen im Handel erhältliche spektralphotometrische Enzymimmunoassay-Kits zur Verfügung, die den routinemäßigen Einsatz dieser Methode erlauben.

In der vorliegenden Arbeit werden quantitative Antikörperbestimmungen (spezifischer IgG- und IgM-Rötelnantikörper) mittels eines solchen standardisierten Test-Kits durchgeführt und die Ergebnisse mit denen des herkömmlichen Hämagglutinationshemmungstests (HAI) und des Hämolyse-in-Gel-Tests (HIG) verglichen. Die Korrelation zwischen EIA-Indices und den bisher gebräuchlichen HAI-Titer-Werten soll die Kommunikation zwischen Labor und Arzt erleichtern.

Es wird außerdem die Verteilung der EIA-Indices ermittelt und der zeitliche Verlauf der EIA-IgM- und -IgG-Antikörpertiter bei Patienten mit frischer Rötelninfektion untersucht.

2. Untersuchungsgut und Methoden

2.1 Sera

Es standen einzelne Serumproben und Serumpaare von Patienten und Klinikpersonal zur Verfügung, bei denen je nach Fragestellung und klinischem Befund (Bestimmung des Immunstatus, Verdacht oder Ausschluß einer frischen Rötelninfektion) einer oder mehrere der unten beschriebenen Tests durchgeführt wurden. Die Sera wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.2 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgG-Antikörpern gegen das Rötelnvirus

2.2.1 Prinzip

Bei diesem Test wird eine mit Rötelnvirus beschichtete Kunststoffkugel mit einer verdünnten Serumprobe inkubiert. Wenn die Probe Antikörper gegen die Rötelnvirusantigene enthält, bildet der Antikörper mit den Rötelnviren auf der beschichteten Kugel einen Immunkomplex. Nach Entfernen (Waschen) der nicht reagierenden Serumbestandteile von der Kugel wird diese mit einem Antikörper-Enzym-Konjugat inkubiert. Das Konjugat besteht aus anti-Human-IgG von der Ziege, das kovalent an Peroxidase gebunden ist. Es reagiert mit dem Antigen-Antikörper-Komplex an der Kugeloberfläche, so daß ein "Sandwich" aus Antigen-Antikörper-Antikörper-Enzym entsteht. Wenn die Probe keine IgG-Antikörper gegen das Rötelnvirus enthält, wird das Konjugat nicht an die Kugeloberfläche gebunden und beim Waschvorgang entfernt. Das Vorhandensein von Enzym (und damit IgG-Antikörpern) an der Kugeloberfläche wird durch Inkubation der gewaschenen Kugel mit einem geeigneten Enzymsubstrat nachgewiesen. Bei diesem Testsystem führt die Enzym-Substrat-Reaktion zu einer gelb-orangen Verbindung, die mit einem Spek-

tralphotometer bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen werden kann.

2.2.2 Durchführung des Tests

Es wurde das Rubazyme-Test-Kit der Firma Abbott verwendet.

Zunächst wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und in die Vertiefungen der Reaktionsplatte (20 Vertiefungen pro Platte) 200 µl Probenverdünnungspuffer (TRIS-Puffer mit Protein-Stabilisatoren und 0,01 % Thiomersal als Konservierungsmittel) pipettiert. Von den Serumproben und Kontrollen - eine stark positive (HAI-Titer ≈80), eine negative und die schwach positive Kontrolle (HAI-Titer ≈10) als Doppelbestimmung - wurden je 10 µl in die entsprechenden Vertiefungen der Reaktionsplatte pipettiert und durch Klopfen an die Platte gemischt. Damit ergab sich eine Verdünnung von 1:20. Dann wurde in jede Vertiefung eine mit Rötelnvirus beschichtete Kunststoffkugel gegeben und durch Klopfen an die Platte gemischt. Es folgte das Abdecken der Platte mit Folie und die Inkubation bei 37 °C für 60 min. Anschließend wurden die Kugeln mit 2 mal 5 ml aqua dest. gewaschen, in jede Vertiefung 200 µl Anti-Human-IgG (Ziege) : Peroxidase (Meerrettich) - Konjugat pipettiert und wieder durch Klopfen an die Platte gemischt. Nach Abdecken der Platte wurde bei 37 °C 60 min inkubiert. Während der letzten 5 bis 10 min der Inkubationszeit wurde die OPD-Substratlösung vorbereitet: o-Phenylendiamin • 2 HCl in Tablettenform wurde in OPD-Lösungsmittel (Citrat-Phosphat-Puffer mit 0,02 % Wasserstoffperoxid und 0,01 % Thiomersal als Konservierungsmittel) gelöst. Die Kugeln wurden mit 2 mal 5 ml aqua dest. gewaschen und in Teströhrchen überführt. In jedes Röhrchen wurden 300 µl der frisch hergestellten OPD-Substratlösung pipettiert,

die Röhrchen abgedeckt und bei Raumtemperatur 30 min stehengelassen. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 2,0 ml 1N Salzsäure in jedes Röhrchen gestoppt; jedes Röhrchen wurde gründlich gemischt. Dann wurde das Spektralphotometer mit aqua dest. auf Null abgeglichen und die Extinktion der einzelnen Kontrollen und Serumproben bei 492 nm gemessen.

2.2.3 Bewertung

A. Immunstatus

Der EIA-Index wurde errechnet, indem die Extinktion einer Probe durch den Mittelwert der doppelt bestimmten schwach positiven Kontrollen ($LPC\bar{x}$) dividiert wurde (vgl. den Rubazyme-Prospekt der Firma Abbott, Wiesbaden-Delkenheim):

$$RI = \frac{\text{Extinktion der Probe}}{LPC\bar{x}}$$

Proben mit einem Index $\geq 1{,}000$ waren Röteln-IgG-Antikörper-positiv, Proben mit einem Index $< 1{,}000$ negativ.

B. Serodiagnose einer frischen Infektion

Der Diagnostikquotient (DQ) für das Probenpaar aus der Akut- ($S1\bar{x}$) und der Rekonvaleszenzphase ($S2\bar{x}$) wurde errechnet, indem entweder $S2\bar{x}$ durch $S1\bar{x}$ oder der Index der Rekonvaleszenzprobe (RI2) durch den der Akutprobe (RI1) dividiert wurde:

$$DQ = \frac{S2\bar{x}}{S1\bar{x}} \quad \text{oder} \quad DQ = \frac{RI2}{RI1}$$

Eine frische Infektion galt als bestätigt, wenn die beiden folgenden Kriterien erfüllt waren:
$DQ \geq 1{,}65$ und $RI2 \geq 1{,}000$.

2.3 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von IgM-Antikörpern

Das Prinzip der Reaktion entspricht dem in Kap.2.2.1 beschriebenen.

2.3.1 Durchführung des Tests

Es wurde das Rubazyme-M-Test-Kit der Firma Abbott verwendet.

Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur erwärmt und dann in Verdünnungsröhrchen je 200 µl Probenverdünnungspuffer (TRIS-Puffer mit Proteinstabilisatoren; Konservierungsmittel Thiomersal) vorgelegt. Je 10 µl der Serumproben bzw. Kontrollen (eine negative, eine hoch positive Kontrolle und drei niedrig-positive Kontrollen) wurden dazugegeben und dann gemischt. In jede Vertiefung der Reaktionsplatte wurden 200 µl Proben-Inkubationspuffer (unbekannter Zusammensetzung; zur Zerstörung des Rheumafaktors) pipettiert, dann je 20 µl der verdünnten Kontrollen und Proben dazugegeben und durch Anstoßen der Platten gemischt. Damit ergab sich eine Verdünnung von 1:200. Nach Abdecken der Platte wurde für 60 min bei 45°C inkubiert, anschließend in jede Vertiefung eine mit Rötelnviren beschichtete Kugel gegeben und durch Anstoßen an die Platte gemischt. Nach erneutem Abdecken der Platte wurde für 90 min bei 45°C inkubiert und die Kugeln dann zweimal mit je 5 ml aqua dest. gewaschen. Danach wurde in jede Vertiefung 200 µl des Anti-Human-IgM (Ziege) : Peroxidase (Meerrettich) - Konjugats pipettiert und durch Anstoßen an die Platte gemischt. Wieder wurde die Platte abgedeckt, für 90 min bei 45°C inkubiert, die Kugeln zweimal mit je 5 ml aqua dest. gewaschen und in Teströhrchen überführt. In jedes dieser Röhrchen und in zwei leere Röhrchen (Substrat-Leerwerte) wurden je 300 µl der frisch angesetzten OPD-Substratlösung (Zusammensetzung s. EIA-IgG-Test) pipettiert und nach Abdecken für 30 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Zum Stoppen der Enzymreaktion wurden in jedes Röhrchen 2,0 ml 1N HCl gegeben. Das Spektralphotometer wurde auf Null abgeglichen und die Extinktion bei 492 nm gemessen.

2.3.2 Bewertung

Der EIA-IgM-Index wurde berechnet, indem die Extinktion einer Probe bzw. der stark positiven und negativen Kontrollen durch den Mittelwert der Extinktionen der 3fach bestimmten schwach positiven Kontrollen (LPC%) dividiert wurde. Ein IgM-Index kleiner als 0,910 war negativ, ein IgM-Index größer als 1,090 war positiv und Beweis für eine frische Rötelninfektion, ein Index zwischen diesen Werten nicht eindeutig.

2.4 Hämagglutinationshemmungstest (HAI)

2.4.1 Prinzip

Das Rötelnvirus agglutiniert Erythrozyten. Eventuell im Serum vorhandene spezifische Antikörper besetzen die für die Agglutination verantwortlichen Oberflächenstrukturen des Virus. Dadurch bleibt die Agglutination später zugesetzter Indikatorerythrozyten aus.

2.4.2 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

A. Hämagglutinations-Salzlösung nach Auletta

9,00 g NaCl
1,00 g $CaCl_2$, wasserfrei
1,00 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
in 1000 ml aqua dest. lösen

B. Dextrose-Gelatine-Veronalpufferlösung (DGV)

in 100 ml aqua bidest. in einem 100 °C-Wasserbad
0,58 g Barbital
0,60 g Gelatine, weiß, gepulvert, lösen (ca. 30 min)
0,38 g Barbital-Natrium
0,02 g $CaCl_2$, wasserfrei
0,12 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$
8,50 g NaCl
10,0 g Glucose

mit aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, autoklavieren

C. Manganchloridlösung (0,5 mol) ca. pH 6,2
9,896 g $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ in 100 ml DGV-Puffer lösen

D. Heparin
500 E/ml ohne Konservierungsstoff

E. HSAG-Puffer
5,6 g 2-(4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1))-äthansulfonsäure
8,19 g NaCl
0,15 g $CaCl_2 \cdot H_2O$
10,0 g Rinderalbumin, trocken, reinst
2,5 mg Gelatine, gepulvert
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen, steril filtrieren, pH-Wert 6,2 bei 25 °C

2.4.3 Vorbehandlung der Sera zur Eliminierung von unspezifischen Inhibitoren (Ansatz 2fach)

Zu 0,1 ml Serum wurden 0,2 ml Aulettalösung und 0,1 ml Heparin-Manganchloridlösung (im Mischungsverhältnis 1:1) gegeben und kräftig geschüttelt, dann 20 min bei 4 °C stehengelassen, 0,4 ml Aulettalösung zugefügt und 20 min bei Stufe 100 unter Kühlung (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Röhrchen überführt und bis zum nächsten Tag bei 4 °C stehengelassen. Wenn sich ein Präzipitat gebildet hatte, wurde das Serum vor der Benutzung nochmals 20 min unter Kühlung zentrifugiert.
Es ergab sich eine Serumverdünnung von 1:8.

2.4.4 Trypsinbehandlung der Erythrozyten und Herstellung der Erythrozytensuspension

Verwendet wurden konservierte Human-Erythrozyten der Blutgruppe 0, Rh-negativ.

Die erforderliche Menge des konservierten Humanblutes wurde in ein graduiertes Zentrifugenröhrchen gefüllt und mit Aulettalösung 3 mal 10 min gewaschen. Vom gewaschenen Sediment wurde eine 10 %ige Erythrozytensuspension in HSAG-Puffer hergestellt. Dann wurden zu 5 ml 10 %iger Ery-Suspension 0,5 ml einer 1 %igen Trypsinlösung zugesetzt, die unter mehrmaligem Umschütteln 1 h bei Zimmertemperatur einwirken konnte. Anschließend wurde 3 mal 5 min mit Aulettalösung gewaschen und vom Sediment wieder eine 10 %ige Ery-Suspension in HSAG-Puffer hergestellt. Von dieser Suspension wurde dann die 0,5 %ige Ery-Suspension für den HAI-Test hergestellt, die nur am selben Tag verwendet wurde.

2.4.5 Hämagglutinationstiterbestimmung des Antigens (HA-Test)

(Ansatz der Antigentitration 4fach auf Kunststofftitrationsplatten)

In 10 Vertiefungen einer Reihe wurden 25 µl Aulettalösung vorgelegt, 25 µl konzentriertes Rötelnantigen (Behringwerke) in die erste Vertiefung gegeben und durchmischt. Dann wurden 25 µl übertitriert und durchmischt usw.; 25 µl aus der letzten Vertiefung wurden verworfen. In jede Vertiefung wurden 25 µl Aulettalösung pipettiert, gut geschüttelt und 1 h bei 4°C gehalten. Als nächstes wurden je 25 µl der 0,5 %igen Human-Ery-Suspension zugegeben.

Zum Anlegen der Erythrozytenkontrolle wurden in zwei Vertiefungen 0,05 ml Aulettalösung vorgelegt und 25 µl Ery-Suspension zugefügt, geschüttelt und 1,5 h bei 37°C inkubiert, dann bei Raumtemperatur abgelesen; bei der Ery-Kontrolle durfte keine Agglutination auftreten.

Beim HA-Test ergab die letzte vollständig aggluti-

nierte Verdünnungsstufe bzw. der Mittelwert aus den vier Ansätzen eine Hämagglutinierende Einheit (1 HAU); es wurde mit 4 HAU gearbeitet.

2.4.6 Durchführung des HAI-Tests

Auf Kunststofftitrationsplatten wurden je 25 µl Aulettalösung in die 2.-11. Vertiefung einer Reihe vorgelegt, in die 1. und 2. Vertiefung je 25 µl vorbehandeltes Serum pipettiert und durchmischt. Von der 2. Vertiefung wurden 25 µl übertitriert, durchmischt usw.; 25 µl aus der letzten Vertiefung wurden verworfen. 25 µl Antigengebrauchsverdünnung (4 HAU) wurden pro Vertiefung zugegeben, geschüttelt und 1 h bei 4°C gehalten. Danach wurden je 25 µl 0,5 %ige Ery -Suspension zugefügt, geschüttelt und 1,5 h bei 37°C inkubiert, dann bei Zimmertemperatur abgelesen: die letzte nicht agglutinierte Verdünnungsstufe gab den Titer an.

In gleicher Weise wie im HA-Test wurde eine Verdünnungsreihe der Antigengebrauchslösung (4 HAU) durchgeführt und im HAI-Test bekannte Kontrollsera (Behring) mit hohem Antikörpertiter, niedrigem AK-Titer und negative Rötelnkontrollsera als Doppelbestimmung mitgeführt. Daneben wurde eine Serumkontrolle durchgeführt, bei der das Patientenserum in der Verdünnung 1:8 und 1:16 durch Zugabe von Ery-Suspension auf das Vorhandensein von unspezifischen Agglutininen überprüft wurde.

2.4.7 Befundbewertung

A. Immunstatus

Antikörpertiter von 1:16 oder mehr wurden positiv gewertet.

B. Diagnose einer frischen Infektion

Eine HAI-Ratio ≥ 4, also ein mindestens 4facher

Antikörpertiteranstieg in einem Serumpaar, wurde als Beweis für eine frische Infektion angesehen.

2.5 Hämolyse-in-Gel-Test (HIG)

2.5.1 Prinzip der Reaktion

Mit Röteln-Antigen sensibilisierte Erythrozyten (Schaf) werden durch Komplement in Gegenwart von entsprechenden Antikörpern hämolysiert. Dabei entspricht die Größe des Hämolysehofes dem logarithmischen Wert der Antikörperkonzentration.

2.5.2 Durchführung des HIG-Tests

Die Patienten- und Kontrollsera wurden 30 min bei 56 °C oder 20 min bei 60 °C inaktiviert. Von der Platte mit vorgestanzten Löchern (Fa. Seromed) wurde evtl. vorhandenes Kondenswasser aus den Löchern abgesaugt und pro Loch 5 µl inaktiviertes Patientenserum eingefüllt. Dann wurde die Platte 24 h bei 4 °C gehalten, lyophilisiertes (Meerschweinchen-) Komplement mit 4 ml Veronalpuffer rekonstituiert und die Platte damit überschichtet, anschließend etwas geschwenkt, bis das Komplement über den Agar gleichmäßig verteilt war. Danach wurde die Platte 3 h bei 37 °C inkubiert und 1 h bei Zimmertemperatur (20 °C) stehengelassen. Das Komplement wurde abgesaugt und dann abgelesen.

Kontrollen:

a) Negativ-Kontroll-Platte

Sie enthielt nicht sensibilisierte Schaferythrozyten und durfte keinen Hämolysering über 8 mm Durchmesser zeigen.

b) Kontrollserum

Auf jeder Positivplatte wurden drei Kontrollsera mitgeführt:

negativ (neg. HAI-Titer; HIG-Durchmesser < 6 mm)

schwach positiv (HAI-Titer 1:16; Durchmesser im HIG-Test 9-11 mm)
stark positiv (HAI-Titer 1:512; HIG-Durchmesser ≥14 mm)

2.5.3 Bewertung

Ein Gesamtdurchmesser von mehr als 6 mm wurde als positiver, ein Durchmesser von weniger als 6 mm als negativer Antikörpertiter gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich des EIA-Tests mit dem HAI-Test

Bei 375 Serumproben wurde sowohl der EIA-IgG-Index als auch der HAI-Titer bestimmt. Abb.1 zeigt, daß der mittlere EIA-Index dem logarithmisch aufgetragenen HAI-Titer in etwa proportional ist. Eine Ausnahme bildet der Bereich zwischen den HAI-Titern 1:8/16 und 1:16; hier verläuft die Kurve wesentlich steiler. Dies ist von praktischer Bedeutung, weil zwischen den beiden Werten die Grenze von positiv und negativ zu bewertenden Antikörpertitern verläuft. Die Maximal- und vor allem die Minimalwerte beim EIA-Index weichen z.T. erheblich vom Mittelwert ab, in Extremfällen um 2-3 Einheiten. Wie aus Abb.2 ersichtlich, handelt es sich hierbei aber um Einzelfälle, die noch näher zu betrachten sind. Die überwiegende Mehrzahl der Punkte schwankt etwa ± 0,5 Einheiten um den Mittelwert.

In Tab.1 sind die mittleren EIA-Indices in Relation zu den entsprechenden HAI-Titern zahlenmäßig aufgeführt, die Schwankungsbreite der Werte, die Anzahl der untersuchten Serumproben und deren Differenzierung in diejenigen, die nach dem EIA als positive Titer und diejenigen, die als negative Titer anzusprechen sind.

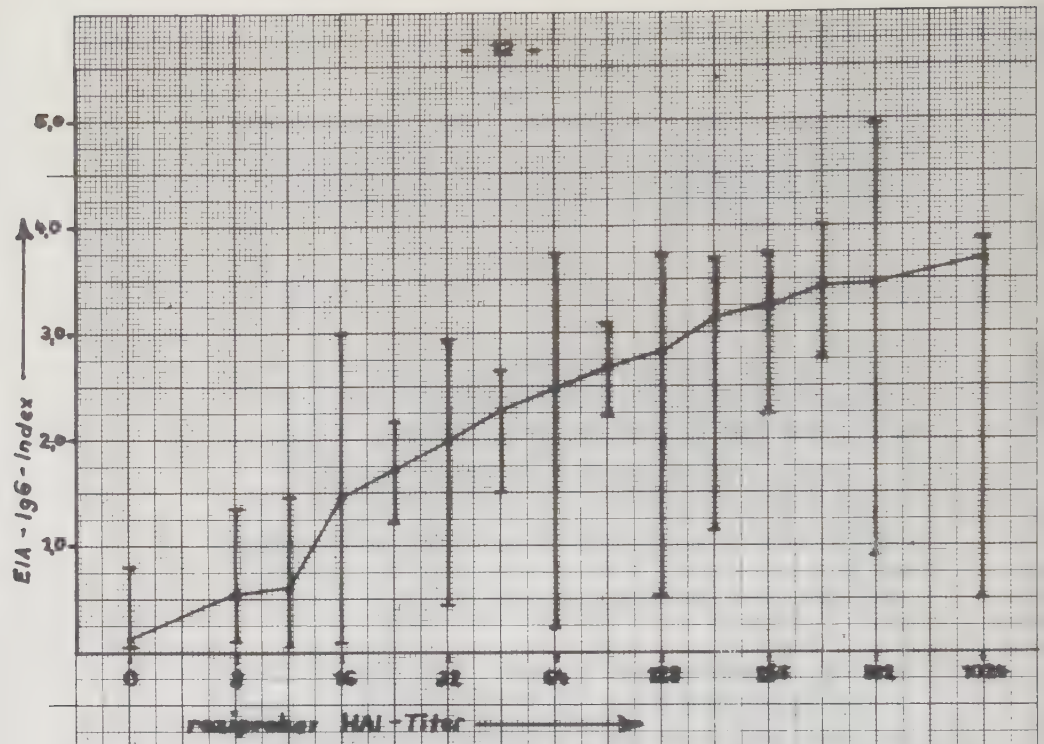


Abb. 1 Relation des EIA-IgG-Index (Mittelwert, Minimal- und Maximalwert) zum HAI-Titer

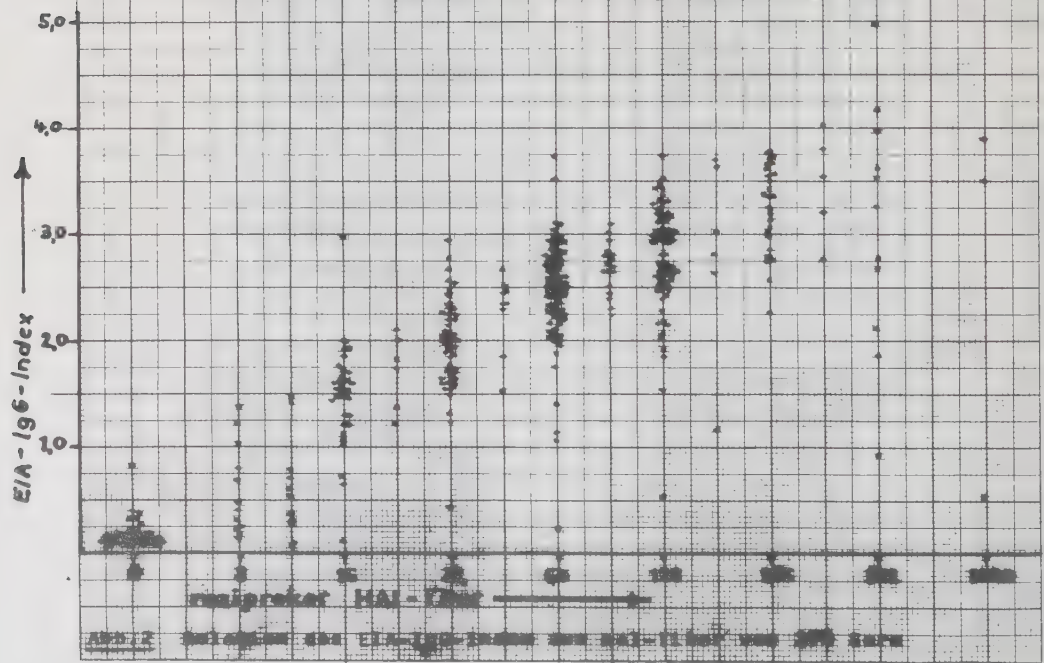


Abb. 2 Relation des EIA-IgG-Index zum HAI-Titer von 200 Sera

BRUNNEN

Tab.1 Relation des EIA-IgG-Index zum HAI-Titer

HAI-Titer	Anzahl der Sera (tot.375)	mittlerer EIA-IgG-Index (Minimal- u. Maximalwert)	Anzahl EIA-posit. Sera	Anzahl EIA-negat. Sera
negativ	43	0,168 (0,006-0,808)	0	43
1:8	12	0,578 (0,110-1,381)	3	9
1:8/16	11	0,615 (0,05 -1,498)	2	9
1:16	32	1,488 (0,107-2,99)	29	3
1:16/32	6	1,722 (1,225-2,194)	6	0
1:32	45	1,980 (0,445-2,966)	44	1
1:32/64	9	2,301 (1,545-2,681)	9	0
1:64	80	2,498 (0,250-3,774)	79	1
1:64/128	16	2,701 (2,251-3,127)	16	0
1:128	68	2,823 (0,55 -3,767)	67	1
1:128/256	6	3,189 (1,173-3,720)	6	0
1:256	28	3,269 (2,260-3,78)	28	0
1:256/512	5	3,478 (2,796-4,036)	5	0
1:512	11	3,462 (0,925-4,996)	10	1
1:1024	3	3,723 (0,532-3,903)	2	1

Tab.2 Relation des EIA-IgG-Index zum HIG-Titer

HIG-Titer	Anzahl der Sera (tot.115)	mittlerer EIA-IgG-Index (Minimal- u. Maximalwert)	Anzahl EIA-posit. Sera	Anzahl EIA-negat. Sera
6	31	0,517 (0,006-2,99)	5	26
6-7	1	1,68	1	0
7-8	4	1,945 (1,430-2,55)	4	0
8-9	5	1,772 (1,562-2,070)	5	0
9-10	7	2,042 (1,60 -2,669)	7	0
10-11	11	2,067 (1,589-2,571)	11	0
11-12	25	2,535 (0,925-4,20)	24	1
12-13	15	2,593 (0,032-3,522)	14	1
13-14	14	3,269 (2,630-4,18)	14	0
14	2	2,767 (2,557-2,978)	2	0

Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, daß bei der Berechnung der mittleren EIA-Indices, die den HAI-Titern 1:128/256, 1:512 und 1:1024 entsprechen, wegen der geringen Anzahl der Proben jeweils der extrem abweichende Minimalwert unberücksichtigt blieb. In allen drei Fällen war zusätzlich der EIA-IgM-Titer bestimmt worden; das Ergebnis war in zwei Proben positiv, in einer lag der IgM-Titer an der Grenze zum positiven Bereich. Das gleiche traf auch für die anderen Sera zu, bei denen entweder der HAI-Titer positiv und der EIA-IgG-Index negativ war oder der HAI-Titer stark und der EIA-IgG-Index schwach positiv: bei fast allen wurde ein positiver IgM-Titer nachgewiesen.

Insgesamt gesehen zeigen HAI- und EIA-IgG-Test eine Übereinstimmung aller untersuchten Sera von 96,5 % (362:375). Die Empfindlichkeit des EIA in Relation zum HAI-Test, also die Übereinstimmung der positiven Sera, liegt bei 97,4 % (301:309), die Spezifität (Übereinstimmung der negativen Sera) bei 92,4 % (61:66).

3.2 Vergleich des EIA-IgG-Tests mit dem HIG-Test

Bei 115 Serumproben wurden EIA- und HIG-Test durchgeführt; die Relation zwischen beiden ist in Abb.3 dargestellt. Auch hier ist die Schwankungsbreite bzw. die Abweichung der Minimal- und Maximalwerte vom Mittelwert recht groß (s. Tab.2).

Die EIA-Mittelwerte gegen den HIG-Titer aufgetragen (Abb.4) weisen keine so regelmäßige Steigung auf wie bei der Relation EIA/HAI in Abb.1; trotzdem läßt sich auch hier die gleiche Tendenz ablesen: in dem Bereich der nach beiden Tests positiven Werte verläuft die Kurve relativ flach, im Grenzbereich zwischen positiven und negativen Werten jedoch steiler.

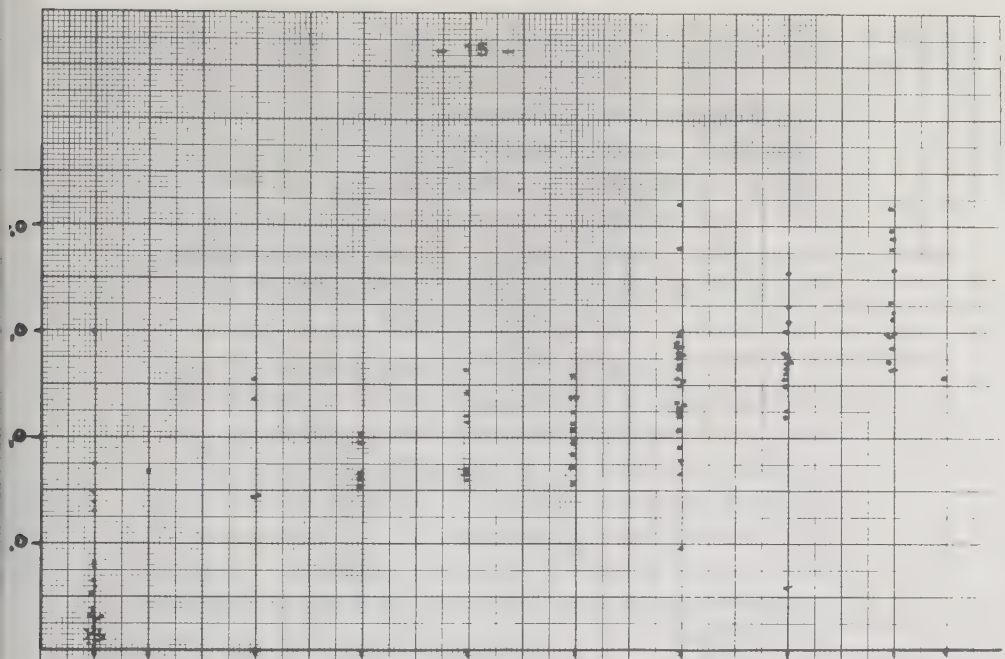


Abb.3 Vergleich des EIA-IgG-Titers mit dem HIG-Titer

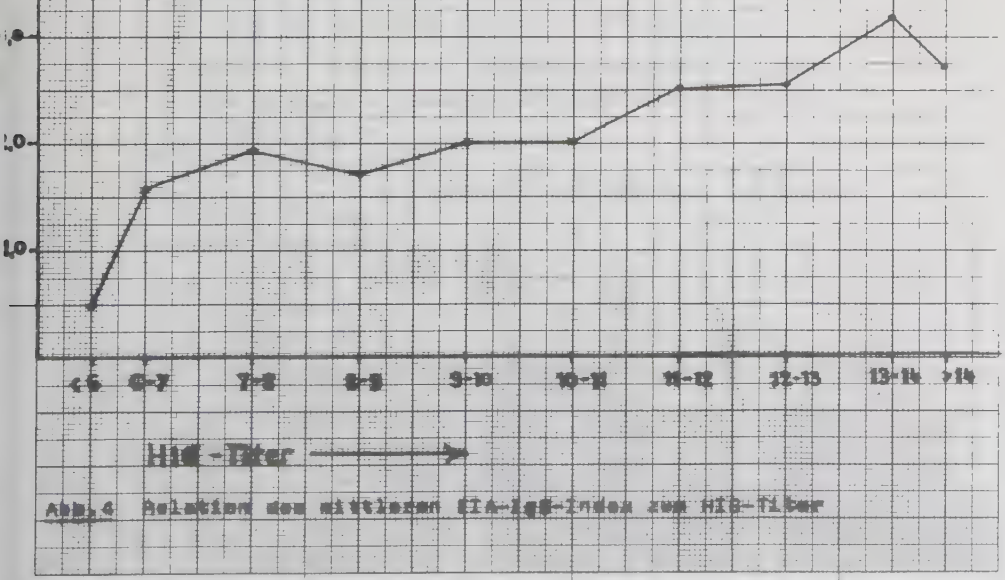


Abb.4 Relation des mittleren EIA-IgG-Index zum HIG-Titer

BRUNNEN

Die Empfindlichkeit des EIAs im Vergleich zum HIG-Test liegt bei 97,6 % (82:84). Die zwei Proben, bei denen der HIG-Titer stark positiv war bei negativem EIA-IgG-Index, wiesen einen IgM-Titer auf, der im einen Fall positiv, im anderen an der Grenze zum positiven Bereich lag; es wurden bei beiden Sera stark positive HAI-Titer gefunden.

Die Spezifität des EIAs in Relation zum HIG-Test entspricht 84 % (26:31). Bei den fünf Serumproben mit positivem EIA- und negativem HIG-Titer ergab der HAI-Test einen schwach positiven Wert von 1:16. Insgesamt beträgt die Übereinstimmung zwischen EIA und HIG-Test 94 % (108:115).

3.3 Gegenüberstellung von EIA und HIG-Test im Vergleich zum HAI-Test

Von den in Kap. 3.1 und 3.2 genannten Sera waren bei 85 gleichzeitig alle drei Untersuchungen durchgeführt worden (EIA-IgG-, HIG- und HAI-Test).

In Tab.3 sind übereinstimmende und widersprüchliche Ergebnisse der drei Methoden aufgegliedert.

Tab.3 Vergleich der Ergebnisse des HAI-, HIG- und EIA-IgG-Tests von 85 untersuchten Sera

HAI	HIG	EIA-IgG	Anzahl der Sera
-	-	-	22
-	-	+	0
-	+	-	0
-	+	+	0
+	+	+	54
+	+	-	2
+	-	+	5
+	-	-	2

Alle HAI-negativen Serumproben waren sowohl HIG- als auch EIA-IgG-negativ; die Spezifität von HIG-Test und EIA in Relation zum HAI-Test beträgt somit 100 %.

54 von 63 HAI-positiven Sera waren auch EIA- und HIG-positiv. Die zwei Proben, deren Antikörpertiter nach HAI- und HIG-Test positiv, im EIA jedoch negativ war, wurden oben schon erwähnt (Kap. 3.2): beide enthielten spezifische IgM-Antikörper. Auch die fünf Fälle, in denen HAI- und EIA-Titer positiv und der HIG-Wert negativ waren, wurden schon besprochen; es handelte sich um kleine Antikörpertiter im Grenzbereich zwischen positiver und negativer Bewertung. Für eines der beiden Sera, bei denen der HAI-Test positive und EIA u. HIG-Test negative Resultate erzielten, gilt entsprechendes; bei der anderen Probe war der zusätzlich untersuchte IgM-Titer stark positiv.

Eine Übersicht über Spezifität, Empfindlichkeit und Übereinstimmung des EIAs und HIG-Tests in Relation zum HAI-Test gibt Tab.4.

Tab.4 Übereinstimmung der Ergebnisse vom HIG-Test und EIA mit dem HAI-Test

	HIG-Test	EIA-IgG-Test
Übereinstimmung aller Sera mit HAI-Test	92 % (78:85)	95 % (81:85)
Empfindlichkeit = Übereinstimmung mit HAI-pos. Sera	89 % (56:63)	94 % (59:63)
Spezifität = Übereinstimmung mit HAI-neg. Sera	100 % (22:22)	100 % (22:22)

3.4 Vergleich des EIA-Diagnostikquotienten mit der HAI-Ratio

Bei 37 Serumpaaren wurden der EIA-Diagnostikquotient (DQ = EIA-IgG-Index des Rekonvaleszentenserums : EIA-IgG-Index des Akutserums) und die HAI-Ratio (= HAI-Titer des Rekonvaleszentenserums : HAI-Titer des Akutserums) bestimmt. Tab.5 zeigt die ermittelten Werte beider Tests.

Tab.5 Vergleich des EIA-DQ mit der HAI-Ratio

HAI-Ratio	mittlerer EIA-DQ (Minimal- u. Maximalwert)	Anzahl der Serumpaare (tot. 37)
≤ 1	0,95 (0,65-1,39)	22
$1 < \text{HAI-Ratio} < 2$	0,98 (0,84-1,08)	5
2	1,04 (0,78-1,26)	6
$2 < \text{HAI-Ratio} < 4$	2,99 (1,33/4,65)	2
32	3,24	1
128	34,77	1

In 34 Fällen waren die Ergebnisse in bezug auf eine frische Rötelninfektion übereinstimmend negativ (HAI-Ratio < 4; DQ $< 1,65$), zweimal eindeutig positiv. Bei einem Serumpaar waren die Resultate widersprüchlich (HAI-Ratio < 4; DQ = 4,65).

3.5 IgM-Antikörperbestimmung mittels EIA bei akuter Rötelninfektion

In Tab.6 sind die EIA-IgM- und -IgG-Indices und die HAI-Titer von 15 Patienten zusammengestellt, bei denen entweder aufgrund des positiven IgM-Titers einer einzelnen Serumprobe, des positiven EIA-DQ bei Serumpaaren oder beidem die Diagnose einer akuten Rötelninfektion gestellt wurde. Es wurde versucht, den Tag des Erkrankungsbeginns (Kriterium:

Tab.6 EIA-IgM-, EIA-IgG-Index und HAI-Titer an verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn einer akuten Rötelninfektion

Patient	Tage nach Erkrankungsbeginn	EIA-IgM-Index	EIA-IgG-Index	HAI-Titer
1	11	2,943	-	1:4096
	16	1,870	-	1:4096/8192
2	1	0,47	0,285	1:8/16
	7	>5,83	0,925	1:512
3	3-4	1,401	1,173	1:128/256
	36	2,475	4,996	1:512
4	1-2	0,305	0,114	neg.
	23	2,328	2,685	1:512
5	2	1,589	0,369	1:8/16
6	2	1,251	0,445	1:32
7	4	2,869	0,55	1:128
8	8	2,654	1,565	1:128
9	11	4,905	1,862	1:512
10	>12	1,897	2,140	1:512
11	14	1,865	3,369	1:128
12	15	1,763	2,960	1:128
13	16	1,253	3,341	1:128
14	26	1,159	2,796	1:256/512
15	54	1,474	3,771	1:256

erste klinische Symptome bzw. Ausbruch des Exanthems) bei den behandelnden Ärzten zu erfragen, um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der EIA-IgM- und -IgG-Antikörpertiter machen zu können; die Zeit vom Auftreten der ersten Symptome bis zur Blutentnahme war in allen Fällen ziemlich genau in Erfahrung zu bringen, obwohl die Erkrankung bei einigen Patienten schon mehrere Monate zurücklag.

Positive IgM-Titer wurden zwischen dem 2. und 54. Tag nach Erkrankungsbeginn gefunden, negative

IgM-Titer am 1. und 2. Tag.

Beim EIA-IgG-Titer wurde in einem Fall schon am 3. Tag ein positiver Wert erreicht, während in anderen Proben zwischen dem 1. und 7. Tag nach Exanthemausbruch negative IgG-Titer vorlagen. Nach dem 8. Tag waren alle EIA-IgG-Titer positiv.

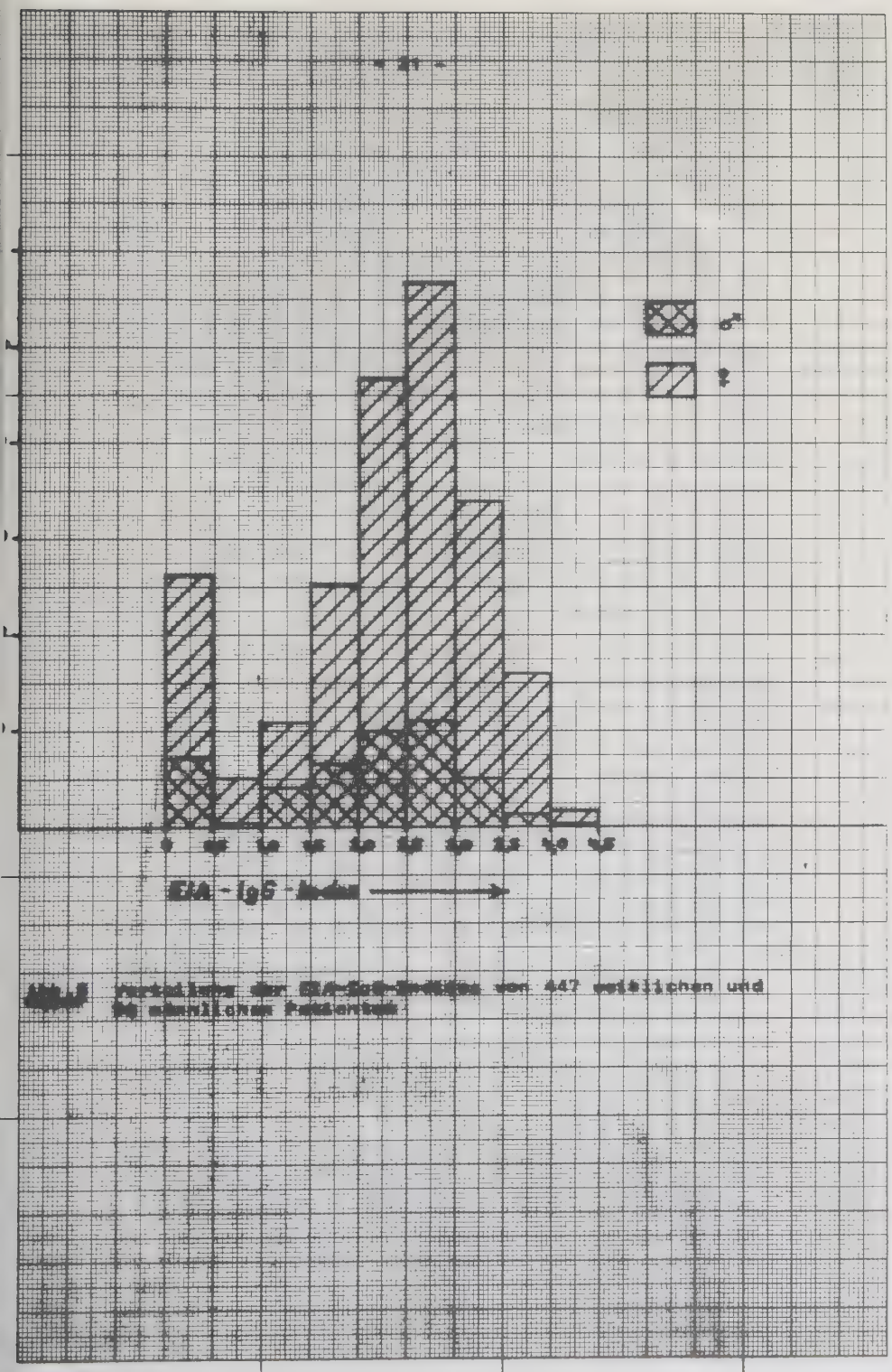
3.6 Verteilung der EIA-IgG-Indices

Abb.5 zeigt die Verteilung der EIA-IgG-Indices von 90 Serumproben männlicher Patienten und 447 Sera weiblicher Patienten. Es wird deutlich, daß der größte Teil der Werte im eindeutig positiven oder negativen Bereich liegt, während die Zahl der Indices um den Grenzwert 1,0 relativ gering ist.

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied ist nicht festzustellen. Auch die prozentuale Verteilung von positiv und negativ zu bewertenden Antikörpertitern ist bei männlichen und weiblichen Patienten erwartungsgemäß gleich (s. Tab.7); im Durchschnitt sind 85 % der untersuchten Sera Antikörper-positiv und 15 % -negativ.

Tab.7 Verteilung von EIA-IgG-positiven und -negativen Sera bei männlichen und weiblichen Patienten

	♂	♀
Anzahl EIA-IgG-positiver Sera	76 (84 %)	384 (86 %)
Anzahl EIA-IgG-negativer Sera	14 (16 %)	63 (14 %)
Gesamtzahl der Sera	90	447



4. Diskussion

Der allgemein anerkannte Hämagglutinationshemmungstest ist zeitaufwendig und arbeitsintensiv (32, 37, 39, 48), der Hämolyse-in-Gel-Test ist zur Diagnostik frischer Infektionen weniger gut geeignet, da er keine IgM-Antikörper anzeigt; dadurch ist ein signifikanter Antikörpertiteranstieg (IgM- und IgG-AK) nur schwer nachweisbar (19, 35).

Auch die herkömmlichen Verfahren zum Nachweis von spezifischen IgM-Antikörpern wie z.B. der HAI-Test nach Trennung der IgM-AK durch die Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (1, 7, 28) oder Gelfiltration (31), der Immunfluoreszenztest (11), der Radioimmunoassay (20) oder der Immunadhärenztest (25) sind sehr aufwendig.

Deshalb hat der Enzymimmunoassay zur selektiven Bestimmung der IgG- und IgM-Antikörpertiter bereits in einem frühen Stadium bei verschiedenen Untersuchern Interesse gefunden. Als entscheidende Vorteile des EIA, dessen Prinzip auch in den Veröffentlichungen von Voller et al. (44) und Vogt (43) beschrieben wird, werden die einfache technische Durchführung, der geringe Zeitaufwand, die hohe Empfindlichkeit und Spezifität, die objektive Bewertung der Ergebnisse mittels Spektralphotometer und die Sicherheit und Stabilität der Reagenzien (im Vergleich zum Radioimmunoassay) genannt. Außerdem werden nur geringe Mengen von Serum benötigt, und bei der IgG-AK-Bestimmung ist eine Vorbehandlung der Sera nicht notwendig (14, 15, 23, 24, 48).

In den vorliegenden Untersuchungen, die dieses Verfahren in seiner routinemäßigen Anwendung im Labor wiederspiegeln, ergab sich beim Vergleich des EIA mit dem HAI-Test eine Übereinstimmung von

96,5 %. Der überwiegende Teil der widersprüchlichen Ergebnisse zwischen beiden Tests trat bei kleinen Antikörpertitern auf: in 5 Fällen von insgesamt 375 war der EIA-IgG-Titer schwach positiv bei HAI-Titern von 1:8 und 1:8/16. Zartarian et al. (48) versuchen dies damit zu erklären, daß beim HAI-Test durch die Vorbehandlung der Sera zur Beseitigung unspezifischer Inhibitoren der Titer der spezifischen Antikörper vermindert werden kann. Ob in den genannten fünf Fällen eine Immunität vorliegt oder ob man die Ergebnisse des EIA als falsch-positiv bezeichnen muß, ist ungewiß.

Vejtorp et al. (39, 41), Best et al. (3) und Forghani et al. (14) kommen in ihren Untersuchungen übereinstimmend zu dem Schluß, daß solche Resultate die größere Empfindlichkeit des EIA gegenüber dem HAI-Test aufzeigten und daß deshalb die HAI-Titer als falsch-negativ anzusehen seien.

In 6 von 8 Proben, bei denen der EIA-IgG-Titer negativ, der HAI-Titer jedoch positiv war, konnte ein positiver IgM-Titer nachgewiesen werden. Möglicherweise werden beim HAI-Test nicht nur spezifische IgG-Antikörper, sondern in wechselndem Ausmaß auch IgM-Antikörper erfaßt, während mit dem EIA selektiv IgG- oder IgM-AK nachgewiesen werden können. Somit können - in Übereinstimmung mit einer Studie von Leinikki et al. (23) - die negativen EIA-Indices hier nicht als falsch-negativ angesehen werden.

Das gleiche Phänomen führt auch zu einer relativ stärkeren Streuung der EIA-IgG-Indices bei hohen HAI-Titern.

Wenn man von dieser im Verhältnis zur Gesamtheit der untersuchten Proben geringen Zahl von widersprüchlichen Ergebnissen absieht, reduziert sich die Schwankungsbreite der EIA-Indices um den Mittelwert erheblich. Aus diesem Grund kann bei aus-

schließlicher Anwendung des EIA in der Röteln-serologie unter Vorbehalt empfohlen werden, die in Abb.1 und Tab.1 dargestellte Korrelation von EIA-IgG-Index und HAI-Titer bei der Übermittlung der Werte vom Labor an den behandelnden Arzt anzuwenden, für den im allgemeinen wohl der HAI-Titer, nicht aber der EIA-Index, eine geläufige Größe ist.
Wie schon in Kap.3.1 erwähnt, sind die Mittelwerte der EIA-IgG-Indices dem HAI-Titer in etwa proportional, mit Ausnahme des Grenzbereiches zwischen positiv und negativ zu bewertenden Antikörpertitern (Abb.1: 1:8/16 und 1:16); der EIA zeigt gerade in diesem diagnostisch wichtigen Bereich einen hohen Differenzierungsgrad und ermöglicht so in den meisten Fällen eine klare Aussage über die Immunitätslage (vgl. auch 14: Forghani et al.). Dies bestätigt sich auch bei der Verteilung der EIA-IgG-Indices (Kap.3.6, Abb.5), deren Anzahl im Bereich des Grenzwertes 1,0 gering ist.

Beim Vergleich des EIA (IgG) mit dem HIG-Test sind ähnliche Tendenzen feststellbar. Wegen der geringeren Anzahl der Serumproben (115) sind die in Tab.2 angegebenen EIA-Mittelwerte sicher nicht repräsentativ; trotzdem ist auch hier eine in etwa proportionale Korrelation zwischen beiden Tests erkennbar (Abb.4). Wie auch im Vergleich zum HAI-Test verläuft die Kurve bei kleinen Antikörpertitern steiler als bei stark positiven; wieder wird die große Empfindlichkeit des EIA gerade bei kleinen Antikörpertitern deutlich.

Die Empfindlichkeit des EIA im Vergleich zum HIG-Test entspricht 97,6 %; die widersprüchlichen Ergebnisse der zwei Proben, in denen HIG- (und HAI-) Titer stark positiv und der EIA-IgG-Titer negativ waren, könnten mit dem Vorhandensein von spezifischen IgM-Antikörpern erklärt werden, die sowohl

beim HIG- wie beim HAI-Test zu einem falsch-positiven Ergebnis führen können, während beim EIA die spezifischen IgG-Antikörper selektiv nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu Angaben von Clarke et al. (9), Väänänen u. Vaheri (36), Harnett et al. (19) und Russell et al. (35), nach denen IgM-Antikörper im HIG-Test nicht interferieren. Grillner u. Strannegård (17) bestätigen jedoch eine weitgehende Übereinstimmung der Antikörpertiter im HAI- und HIG-Test, die auch in den oben erwähnten Fällen vorliegt.

Zwei andere Serumproben waren demgegenüber HIG- und EIA-IgG-negativ, während der EIA-IgM- und der HAI-Titer im einen Fall eine stark positive und im anderen eine schwach positive Reaktion zeigten. Eine befriedigende Erklärung für die aufgezeigten Diskrepanzen kann nicht gegeben werden.

Für die übrigen fünf Sera, bei denen die Resultate des EIA- und HIG-Tests widersprüchlich waren (EIA-IgG-positiv, HIG-negativ), gilt wohl in Analogie zum Vergleich EIA/HAI-Test, daß der HIG- wie der HAI-Test bei kleinen Antikörpertitern weniger sensibel zu reagieren scheint als der EIA. Möglicherweise werden auch beim HIG-Test in einigen Fällen spezifische Antikörper durch die Vorbehandlung der Sera vermindert (vgl. auch Morgan-Capner, 32). Daß das Resultat des EIA in diesen fünf Proben nicht als falsch-positiv zu bezeichnen ist, wurde durch den HAI-Test bestätigt: in allen lag der HAI-Titer bei 1:16.

Wegen der Möglichkeit des selektiven Nachweises von IgG- und IgM-Antikörpern mit dem EIA und der hohen Empfindlichkeit auch bei kleinen Antikörpertitern ist dieser Methode gegenüber dem HIG-Test der Vorzug zu geben, zumal der labortechnische Aufwand für beide Verfahren in etwa gleich groß ist.

Bei den 85 Serumproben, die der Gegenüberstellung von HIG-Test und EIA mit dem HAI-Test zugrunde liegen, handelt es sich um einen Teil der Fälle, die schon zum Vergleich des EIA mit dem HAI-Test und des EIA mit dem HIG-Test herangezogen worden sind. Die widersprüchlichen Ergebnisse zwischen den drei genannten Verfahren und ihre möglichen Ursachen wurden schon in diesem Zusammenhang erörtert.

Die Werte für Übereinstimmung, Spezifität und Empfindlichkeit vom HIG-Test und EIA gemessen am HAI-Test lassen keine gravierenden Diskrepanzen erkennen (Tab.4). Bemerkenswert an dieser Gegenüberstellung ist die - wenn auch nicht wesentlich - größere Übereinstimmung des EIA mit dem HAI-Test.

Die Differenz beim Vergleich vom EIA mit dem HAI-Test zu den in Kap. 3.1 genannten Zahlen (Übereinstimmung 96,5 %, Empfindlichkeit 97,4 %, Spezifität 92,4 % bei 375 untersuchten Sera) ist auf die geringere Anzahl der berücksichtigten Sera zurückzuführen.

Bei den bisher besprochenen Ergebnissen handelte es sich überwiegend um eine Untersuchung einzelner Serumproben, um die Immunitätslage der Patienten festzustellen. Eine Möglichkeit der Diagnostik einer frischen Rötelninfektion ist der Nachweis eines signifikanten Antikörpertiteranstiegs im Rekonvaleszentenserum im Vergleich zum Akutserum.

Unter diesem Aspekt wurden 37 Serumpaare untersucht. In 36 Fällen stimmten die Resultate vom EIA und HAI-Test überein, bei einem Serumpaar waren sie widersprüchlich: die HAI-Ratio war kleiner als 4 (1. Probe 1:128/256; 2. Probe 1:512), während der EIA-DQ mit einem Wert von 4,65 eine frische Infektion eindeutig bestätigte. Von beiden Sera war zusätzlich der EIA-IgM-Titer bestimmt worden; sowohl in dem Akutserum, das 3-4 Tage nach Erkrankungsbeginn entnommen worden war, als auch im Rekonvaleszenten-

serum (36 Tage nach Erkrankungsbeginn) war der IgM-Titer positiv.

Der Grund für die widersprüchlichen Resultate liegt m.E. in erster Linie in der relativ späten Entnahme der ersten Serumprobe; obwohl das zu diesem Zeitpunkt ungewöhnlich ist, war der IgG-Titer dieser ersten Probe schon positiv (EIA-IgG-Index 1,173). Möglicherweise war den ersten Symptomen der Erkrankung schon eine klinisch inapparente Phase vorausgegangen. In einem solchen Fall kann der Nachweis eines weiteren Titeranstiegs mit einer genauen, spektralphotometrischen Ermittlung der Antikörperkonzentration eher erwartet werden als mit dem Ablesen der Hämagglutination in einer Verdünnungsreihe wie beim HAI-Test.

Bei den beiden Serumpaaren, deren HAI-Ratio und EIA-DQ übereinstimmend positive Resultate aufwiesen, war die Akutprobe schon am 1. oder 2. Tag nach Erkrankungsbeginn entnommen worden; hier ist ein signifikanter Titeranstieg leichter nachweisbar.

Eine weitere Ursache für die relative Unempfindlichkeit des HAI-Tests beim Nachweis eines Antikörpertiteranstiegs könnte darin liegen, daß spezifische IgM-Antikörper das Ergebnis beeinflussen können; da gerade in einer Akutprobe ein hoher IgM-Titer vorliegen kann, vermindert sich die Differenz zwischen den HAI-Titer-Werten eines Serumpaares u.U. soweit, daß eine akute Infektion nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Auch bei der Diagnostik der akuten Rötelninfektion zeigt sich also, daß der selektive Nachweis von IgG-Antikörpern und die hohe Empfindlichkeit des EIA zu klareren Ergebnissen führt als der HAI-Test.

Neben einem signifikanten Antikörpertiteranstieg in einem Serumpaar kann auch der Nachweis von spe-

zifischen IgM-Antikörpern in einer einzelnen Serumprobe beweisend sein für eine frische Rötelninfektion.
Bei 15 Patienten war eine Rötelninfektion aufgrund eines positiven EIA-IgM-Titers oder EIA-DQ diagnostiziert worden (Tab.6).

Positive IgM-Titer wurden zwischen dem 2. und 54. Tag nach Erkrankungsbeginn gefunden. Bei der geringen Zahl der Fälle ist es schwierig, hieraus allgemein gültige Schlüsse zu ziehen; es läßt sich jedoch die Tendenz erkennen, daß der Gipfel des IgM-Titeranstiegs etwa 7-14 Tage nach Erkrankungsbeginn erreicht wird. Daß bei zwei Patienten der positive IgM-Titer noch nach 36 und sogar 54 Tagen persistierte, kann als Ausnahme gewertet werden; in einem Fall lag eine Meningoencephalitis vor.

Meurman (29) und Vejtorp et al. (40) fanden maximale IgM-Titer ungefähr 8-10 Tage nach Exanthemausbruch, Best et al. (2) zwischen dem 5. und 14. Tag. Bei komplikationslosem Verlauf sind nach Angaben von Robertson et al. (34) positive IgM-Titer bis zu einem Monat nachweisbar; andere Autoren geben ähnliche Werte an (7, 33). Über diese Zeit hinaus persistierende positive IgM-Titer werden in Fällen beschrieben, in denen eine Rötelnerkrankung zu Komplikationen wie Polyarthritis (29, 34), Thrombozytopenische Purpura (18) oder Meningoencephalitis (16) geführt hat.

Über die Zeitspanne nach Erkrankungsbeginn, nach der frühestens ein positiver IgM-Titer erwartet werden kann, werden in den genannten Veröffentlichungen keine genauen Angaben gemacht. Nach Untersuchungen von Champsaur et al. (8) wird der EIA-IgM-Titer schon einen Tag nach Exanthemausbruch positiv. Da jedoch nach eigener Untersuchung

(s. Tab.6) am 1. und 2. Tag einer nachgewiesenen Rötelnerkrankung negative IgM-Titer gefunden wurden, kann zusammenfassend festgestellt werden, daß eine akute Rötelninfektion etwa zwischen dem 3. und 20. Tag nach Exanthemausbruch mit großer Wahrscheinlichkeit mittels EIA-IgM-Index diagnostiziert werden kann. In der Praxis bedeutet dies, daß in der genannten Zeit mit einer einzelnen Serumprobe die Erkrankung innerhalb kurzer Zeit verifizierbar ist.

Der IgG-Titer erreicht nach Angaben von Vejtorp et al. (40) sein Maximum etwa nach 50-120 Tagen und persistiert bekanntlich lebenslänglich.

Dem entsprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung: am 1.-7. Tag nach Erkrankungsbeginn wurden negative EIA-IgG-Titer gefunden, in einem oben schon einmal erwähnten Fall (Tab.6 - Patient 3) wurde jedoch schon am 3. oder 4. Tag ein positiver Wert erreicht; es handelte sich um einen 10jährigen Patienten mit einer Meningoencephalitis, bei dem in der zweiten Serumprobe vom 36. Tag nach Auftreten der ersten Symptome ein weiterer starker Anstieg des EIA-IgG-Index auf 4,996 und auch des EIA-IgM-Index auf 2,475 zu verzeichnen war. Die ungewöhnlichen Serumwerte spiegeln hier den komplikationsreichen Krankheitsverlauf wieder und sind deshalb als Ausnahme zu werten.

Im allgemeinen ist ein positiver IgG-Titer erst nach etwa 8 Tagen zu erwarten, der maximale Wert frühestens 1-2 Wochen später. Daher kann der Beweis für eine Rötelninfektion mittels EIA-DQ auch bei relativ später Entnahme der Akutprobe noch erbracht werden, während dies beim HAI-Test unsicher ist.

Der Vergleich der EIA-IgG- mit den HAI-Titerwerten (Tab.6) läßt noch einmal deutlich werden, daß im allgemeinen eine gute Übereinstimmung zwischen beiden besteht, daß aber anscheinend ein positiver IgM-Titer den HAI-Wert erhöhen kann: bei Patient 5 (Tab.6) waren zwar HAI- und EIA-IgG-Titer negativ bei positivem EIA-IgM-Index - dagegen waren aber bei den Patienten 2, 6 und 7 EIA-IgM- und HAI-Titer positiv und EIA-IgG-Index negativ.

Abschließend ist festzustellen, daß sich der Enzymimmunoassay als ein zuverlässiges Verfahren in der routinemäßigen Anwendung sowohl zur Bestimmung der Immunitätslage als auch zum Nachweis einer frischen Infektion in der Rötelndiagnostik bewährt hat. Im Vergleich zum Hämagglutinationshemmungstest und Hämolyse-in-Gel-Test sind die hohe Empfindlichkeit dieser Methode und die Möglichkeit des selektiven Nachweises von spezifischen IgG- und IgM-Antikörpern besonders hervorzuheben.

5. Zusammenfassung

Der Enzymimmunoassay wurde in seiner routinemäßigen Anwendung dargestellt und mit dem Hämagglutinationshemmungstest und Hämolyse-in-Gel-Test verglichen. Bei der Untersuchung von insgesamt 375 Serumproben lag die Übereinstimmung aller drei Methoden bei über 90 %, und es ergab sich eine gute Korrelation zwischen den EIA-IgG-Mittelwerten und den entsprechenden HAI-Titern.

Diskrepanzen zwischen Ergebnissen des EIA-IgG-Tests einerseits und HAI- und HIG-Test andererseits traten in einigen Proben mit kleinen Antikörpertitern auf oder bei Sera, die spezifische IgM-Antikörper enthielten. Hier erwies sich der EIA als eine sensible Methode, mit der IgG- und IgM-Antikörper selektiv nachgewiesen werden können.

Auch beim Nachweis eines Antikörpertiteranstiegs bei Serumpaaren zur Diagnostik einer frischen Infektion ist dieses Verfahren sehr zuverlässig; die Übereinstimmung des EIA-Diagnostikquotienten mit der HAI-Ratio betrug 97 % (36:37).

Bei der Bestimmung der EIA-IgM- und EIA-IgG-Titer von 15 Patienten mit akuter Rötelninfektion wurden positive IgM-Titer zwischen dem 2. und 36. Tag nach Erkrankungsbeginn gefunden; in einem Fall spiegelte die Persistenz des positiven IgM-Titers bis zum 54. Tag den komplikationsreichen Krankheitsverlauf wieder. Die EIA-IgG-Titer waren mit einer Ausnahme bis zum 7. Tag nach Exanthemausbruch negativ, danach immer positiv.

Abschließend wurde eine allgemeine Übersicht über die Verteilung der EIA-IgG-Indices von 447 weiblichen und 90 männlichen Patienten gegeben, die erwartungsgemäß keinen geschlechtsspezifischen Unterschied erkennen ließ.

6. Literaturverzeichnis

1 Al-Nakib, W.: Trypsined human O erythrocytes in the detection of rubella-specific IgM by sera fractionation on sucrose density gradient and absorption with staphylococcal protein A, J. clin. Path., 34, (1981), 670-673.

2 Best, J.M., J.E. Banatvala, D. Watson: Serum IgM and IgG responses in postnatally acquired rubella, Lancet II, (1969), 65-68.

3 Best, J.M., G.C. Harcourt, A. Druce, S.J. Palmer, S. O'Shea, J.E. Banatvala: Rubella immunity by four different techniques: results of challenge studies, J. med. Virol., 5, (1980), 239-247.

4 Bidwell, D.E., S.M. Chantler, P. Morgan-Capner, J.R. Pattison: Further investigation of the specifity and sensitivity of ELISA for rubella antibody screening, J. clin. Path., 33, (1980), 200-201.

5 Braun, R., H.W. Doerr, H.P. Geisen, C. Hornig, U. Huschka, K. Munk: Comparison of different methods for the detection of rubella-specific IgM antibodies, J. med. Virol., 8, (1981), 207-214.

6 Castellano, G.A., D.L. Madden, G.T. Hazzard, C.S. Cleghorn, D.V. Vails, A.C. Ley, N.R. Tzan, J.L. Sever: Evaluation of commercially available diagnostic test kits for rubella, J. infect. Dis., 143, (1981), 578-584.

7 Caul, E.O., S.J. Hobbs, P.C. Roberts, S.K.R. Clarke: Evaluation of a simplified sucrose gradient method for the detection of rubella-specific IgM in routine diagnostic practice, J. med. Virol., 2, (1978), 153-163.

8 Champsaur, H., E. Dussaix, P. Tournier: Hemagglutination inhibition, single radial hemolysis, and ELISA tests for the detection of IgG and IgM to rubella virus, J. med.Virol., 5, (1980), 273-286.

9 Clarke, M., J. Boustred, V. Seagroatt, G.C. Schild: The use of single-radial-haemolysis for rubella antibody studies, J. Hyg. (Camb.), 79, (1977), 355-365.

10 Cleary, T.J., A. Cid, B. Ellis, H. Malkus, T. Noto, S. Halbert, A. Castro: A direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies for rubella virus in human sera, Res. Commun. chem. Path. Pharmacol., 19, (1978), 281-293.

11 Dall, V., N.H. Jensen, U. Hansen: Diagnosis of pre- and postnatal rubella by demonstration of specific IgM-class antibodies by a microplate immunofluorescence test, Med. Microbiol. Immunol., 168, (1980), 73-80.

12 Diment, J.A., S.M. Chantler: Enzyme immunoassay for detection of rubella specific IgM antibody, Lancet, (1981), 394-395.

13 Engvall, E., P. Perlmann: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes, J. Immunol., 109, (1972), 129-135.

14 Forghani, B., N.J. Schmidt: Antigen requirements, sensitivity, and specifity of enzyme immunoassays for measles and rubella viral antibodies, J. clin. Microbiol., 9, (1979), 657-664.

15 Gravell, M., P.H. Dorsett, O. Gutenson, A.C. Ley: Detection of antibody to rubella virus by enzyme-linked immunosorbent assay, J. infect. Dis., 136, Suppl., (1977), 300-303.

16 Griffiths, P., C. Clarke, M. Richards: Family outbreak of rubella with encephalopathy occuring in sibling with maternal HLA crossover, Lancet, (1980), 1143.

17 Grillner, L., Ö. Strannegård: Evaluation of the hemolysis-in-gel test for the screening of rubella immunity and the demonstration of recent infection, J. clin. Microbiol., 3, (1976), 86-90.

18 Haire, M., D.S.M. Hadden: Immunoglobulin responses in rubella and its co mplications, Brit. med. J., 3, (1970), 130-132.

19 Harnett, G.B., C.A. Palmer, E.M. Mackay-Scollay: Single-radial-hemolysis test for the assay of rubella antibody in antenatal, vaccinated, and rubella virus-infected patients, J. infect. Dis., 140, (1979), 937-944.

20 Kangro, H.O., C. Jackson, R.B. Heath: Comparison of radioimmunoassay and the gel filtration technique for routine diagnosis of rubella during pregnancy, J. Hyg. (Camb.), 87, (1981), 249.

21 Kurtz, J.B., A. Malic: Rubella-specific IgM detected by an antibody capture assay/ ELISA technique, J. clin. Path., 34, (1981), 1392-1395.

22 Kurtz, J.B., P.P. Mortimer, P.R. Mortimer, P. Morgan-Capner, M.S. Shafi, G.B.B. White: Rubella antibody measured by radial haemolysis. Characteristics and performance of a simple screening method for use in diagnostic laboratories, J. Hyg. (Camb.), 84, (1980), 213-223.

23 Leinikki, P.O., I. Shekarchi, P. Dorsett, J.L. Sever: Enzyme-linked immunosorbent assay determination of specific rubella antibody levels in micrograms of immunoglobulin G per milliliter of serum in clinical samples, J. clin. Microbiol., 8, (1978), 419-423.

24 Lim, Y.S., C.C. Lam, S.K. Lam: Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of recent rubella infection, J. clin. Path., 35, (1982), 101-103.

25 Logt, J.T.M. van der, A.M. van Loon, J.van der Veen: Hemadsorption immunosorbent technique for determination of rubella immunoglobulin M antibody, J. clin. Microbiol., 13, (1981), 410-415.

26 Loon, A.M. van, J.T.M. van der Logt, J. van der Veen: Evaluation of commercial ELISA tests, Lancet, (1980), 319-320.

27 Loon, A.M. van, J.T.M. van der Logt, J. van der Veen: Enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of antibody against cytomegalo virus and rubella virus in a single serum dilution, J. clin. Path., 34, (1981), 665-669.

28 Luton, P., G.L. Ridgway: Use of the ultracentrifuge vertical rotor in the detection of rubella-specific IgM on a sucrose density gradient, J. clin. Path., 32, (1979), 931-934.

29 Meurman, O.H.: Persistence of immunoglobulin G and immunoglobulin M antibodies after postnatal infection determined by solid-phase radioimmunoassay, J. clin. Microbiol., 7, (1978), 34-38.

30 Miles, L.E.M., C.N. Hales: Labelled antibodies and immunological assay systems, Nature, 219, (1968), 186.

31 Morgan-Capner, P., E. Davies, J.R. Pattison: Rubella-specific IgM detection using Sephacryl S-300 gel filtration, J. clin. Path., 33, (1980), 1082-1085.

32 Morgan-Capner, P., J. Hazel, M. Pullen, J.R. Pattison, D.E. Bidwell, A. Bartlett, A. Voller: A comparison of three tests for rubella antibody screening, J. clin. Path., 32, (1979), 542-545.

33 Pattison, J.R., D.S. Dane, J.E. Mace: Persistence of specific IgM after natural infection with rubella virus, Lancet, (1975), 185-187.

34 Robertson, P.W., S.M. Bell: Prolonged rubella IgM antibody response, Med. J. Aust., 2, (1974), 857.

35 Russell, S.M., S.R. Benjamin, M. Briggs, M. Jenkins, P.P. Mortimer, S.B. Payne: Evaluation of the single radial haemolysis (SRH) technique for rubella antibody measurement, J. clin. Path., 31, (1978), 521-526.

36 Väänänen, P., A. Vaheri: Hemolysis-in-gel test in immunity surveys and diagnosis of rubella, J. med. Virol., 3, (1979), 245-252.

37 Vaheri, A., E.-M. Salonen: Evaluation of solid-phase enzyme--immunoassay procedure in immunity surveys and diagnosis of rubella, J. med. Virol., 5, (1980), 171-181.

38 Vaheri, A.; P. Väänänen, E.-M. Salonen, J. Suni: Rubella antibody determination from heparinised finger-tip blood by single radial haemolysis and enzyme immunoassay, J. clin. Path., 33, (1980), 845-847.

39 Vejtorp, M.: Enzyme-linked immunosorbent assay for determination of rubella IgG antibodies, Acta path. microbiol. scand., Sect. B, 86, (1978), 387-392.

40 Vejtorp, M., E. Fanøe, J. Leerhoy: Diagnosis of postnatal rubella by the enzyme-linked immunosorbent assay for rubella IgM and IgG antibodies, Acta path. microbiol. scand., Sect. B, 87, (1979), 155- 160.

41 Vejtorp, M., J. Leerhoy: Comparison of the sensitivity of ELISA and the haemagglutination-inhibition test for routine diagnosis of rubella, Acta path. microbiol. scand., Sect. B, 88, (1980), 349-350.

42 Vesikari, T., A. Vaheri: Rubella: a method for rapid diagnosis of a recent infection by demonstration of the IgM antibodies, Brit. med. J., 1, (1968), 221-223.

43 Vogt, W.: Praktische Anwendung des Enzymimmunoassays in klinischer Chemie und Serologie, Thieme, Stuttgart, (1979).

44 Voller, A., A. Bartlett, D.E. Bidwell: Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques, J. clin. Path., 31, (1978), 507-520.

45 Voller, A., D.E. Bidwell: A simple method for detecting antibodies to rubella, Brit. J. exp. Path., 56, (1975), 338-339.

46 Voller, A., D.E. Bidwell: Enzyme-immunoassays for antibodies in measles, cytomegalovirus infections and after rubella vaccination, Brit. J. exp. Path., 57, (1976), 243-247.

47 Weemen, B.K. van, A.H.W.M. Schuurs: Immunoassay using antigen-enzyme conjugate, Fed. Europ. biochem. Soc. Lett., 15, (1971), 232-237.

48 Zartarian, M.V., G. Friedly, E.M. Peterson, L.M. de la Maza: Detection of rubella antibodies by hemagglutination inhibition, indirect fluorescent-antibody test, and enzyme-linked immunosorbent assay, J. clin. Microbiol., 14, (1981), 640-645.

Herrn Prof. Dr. May danke ich für die Überlassung des Themas, für seine Anregungen und für die Durchsicht der Arbeit.

Herzlichen Dank auch den Mitarbeiterinnen des Viruslabors (Serologie), insbesondere Frau Kauk, für die freundliche Unterstützung und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. Schopf für die Übernahme des Koreferats.

Lebenslauf

Am 1. Dezember 1957 wurde ich als Tochter des kaufmännischen Angestellten Hans Arndt und seiner Ehefrau Ruth Arndt geb. Willer in Frankfurt am Main geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule von 1964 bis 1967 und des Gymnasiums in Frankfurt-Höchst legte ich im Dezember 1975 die Reifeprüfung ab.

Im Sommerhalbjahr 1976 begann ich das Studium der Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt, das ich im Juli 1981 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit September 1981 bin ich als Assistentin in der Abteilung für Zahn-, Mund- und Kieferchirurgie der Universitäts-Zahnklinik in Frankfurt tätig.

Frankfurt, 31.1.83

Rita Arndt

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

Vergleichende Untersuchung des Enzymimmunoassays mit dem Hämagglutinationshemmungstest und dem Hämolyse-in-Gel-Test in der Röteln-diagnostik

im Zentrum der Hygiene unter Leitung von Prof. Dr. G. May ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, 31.1.83